

Analisis Molekuler dan Uji Daya Hasil Galur-galur BC₂F₈ Padi *Pup1* (Molecular Analysis and Yield Trials of BC₂F₈ *Pup1* Rice Lines)

Joko Prasetyono*, Tasliah, Ma'sumah, Nurul Hidayatun, Tintin Suhartini, dan Ida H. Soemantri

Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Bioteknologi dan Sumber Daya Genetik Pertanian, Jl. Tentara Pelajar 3A, Bogor 16111 Indonesia
Telp. (0251) 8337975; Faks. (0251) 8338820; *E-mail: jokoprasetyono@yahoo.com

Diajukan: 15 Januari 2016; Direvisi: 11 Maret 2016; Diterima: 23 Mei 2016

ABSTRACT

Improved rice varieties at areas that have problems with the availability of phosphorus (P) is very important. *Pup1* locus, the locus containing genes that play a role in the P uptake, has been well mapped and some markers for selection have been developed. Based on previous studies, BC₂F₈ lines have been obtained from crosses of Dodokan × Kasalath (DK), Dodokan × NIL-C443 (DN), Situ Bagendit × Kasalath (SK), Situ Bagendit × NIL-C443 (SN), Batur × Kasalath (BK), and Batur × NIL-C443 (BN). This study aimed to evaluate the BC₂F₈ lines at molecular level as well as their yield potential. The molecular research was conducted from November 2013 to June 2014 at ICABIOGRAD, Indonesia and IRRI, Philippines, whereas the field trials were conducted at Taman Bogo Field Station, Lampung and a farmer's land at Sukabumi, West Java. Molecular analysis demonstrated that all of the BC₂F₈-*Pup1* lines contained *Pup1* locus. However, three lines (B5-SK5, B9-SN2, and C9-BN2) containing the *Pup1* locus were found in heterozygotes condition. All of the *Pup1* lines still retained the genome composition of the parent, except for B7-SK7, C10-BN3, and C11-BN4. B1-SK1, B2-SK2, B3-SK3, B4-SK4, B6-SK6, B9-SN2, C4-BK4, C7-BK7, and C12-BN5 *Pup1* lines have yield more than their recurrent parents (Situ Bagendit or Batur) in areas with either low or enough available P conditions. B6-SK6 dan C12-BN5 *Pup1* lines have yield more than their recurrent parents and check varieties (Inpago 7 dan Inpago 8) in area with low available P condition. These lines could be used for multilocation trial.

Keywords: Rice, *Pup1*, molecular analysis, yield potency.

ABSTRAK

Perbaikan varietas padi untuk daerah yang memiliki masalah ketersediaan fosfor (P) sangat penting dilakukan. Locus *Pup1* sebagai locus yang berisi gen-gen yang berperan dalam penangkapan P telah dipetakan dengan baik dan marka untuk seleksinya telah dibuat. Berdasarkan penelitian sebelumnya, telah diperoleh galur BC₂F₈ persilangan Dodokan × Kasalath (DK), Dodokan × NIL-C443 (DN), Situ Bagendit × Kasalath (SK), Situ Bagendit × NIL-C443 (SN), Batur × Kasalath (BK), dan Batur × NIL-C443 (BN). Penelitian ini bertujuan menganalisis galur-galur BC₂F₈ secara molekuler dan mengevaluasi potensi hasil galur-galur tersebut pada kondisi lapang yang berbeda. Penelitian berlangsung mulai bulan November 2013 s.d. Juni 2014. Penelitian molekuler dilakukan di BB Biogen, Indonesia dan IRRI, Filipina, sedangkan penelitian lapang dilakukan di KP Taman Bogo, Lampung dan lahan petani di Sukabumi, Jawa Barat. Berdasarkan analisis molekuler, diperoleh hasil seluruh galur BC₂F₈ mengandung locus *Pup1*, namun ada tiga galur (B5-SK5, B9-SN2, dan C9-BN2) yang mengandung locus *Pup1* dalam kondisi heterozigot. Susunan genom sebagian besar galur *Pup1* masih mengikuti susunan genom tetuanya, kecuali B7-SK7, C10-BN3, dan C11-BN4. Galur B1-SK1, B2-SK2, B3-SK3, B4-SK4, B6-SK6, B9-SN2, C4-BK4, C7-BK7, dan C12-BN5 memiliki bobot ubinan lebih banyak dibanding dengan tetua pemulihnya (Situ Bagendit atau Batur) pada kondisi P kurang atau cukup tersedia. Galur B6-SK6 dan C12-BN5 memiliki bobot ubinan lebih banyak dibanding dengan tetua pemulihnya dan varietas cek (Inpago 7 atau Inpago 8) pada kondisi P kurang tersedia. Galur-galur tersebut dapat digunakan untuk uji multilokasi.

Kata kunci: Padi, *Pup1*, analisis molekuler, potensi hasil.

PENDAHULUAN

Lahan-lahan marginal di Indonesia sangat luas dan belum dimanfaatkan secara optimal. Penggunaan tanaman yang adaptif terhadap lahan marginal akan sangat membantu petani karena input yang digunakan tidak terlalu besar. Salah satu kendala lahan marginal adalah kurangnya ketersediaan fosfor (P) bagi tanaman, padahal unsur ini sangat dibutuhkan oleh padi pada setiap tahap pertumbuhannya (Yuwono, 2009). Kekurangan unsur P akan mengurangi jumlah anakan, menyebabkan pertumbuhan menjadi kerdil, dan menurunkan jumlah butir gabah per malai. Daun padi akan berwarna hijau tua dan ukurannya lebih panjang daripada tanaman normal. Pada beberapa varietas, daun-daun tuanya berubah warna menjadi oranye atau keungu-unguan (Chen *et al.*, 2014).

Lokus *phosphorus uptake 1* (*Pup1*) merupakan lokus yang ikut berperan dalam penangkapan P pada tanaman padi. Lokus ini terletak pada kromosom 12, dipetakan pertama kali oleh Wissuwa *et al.* (1998) menggunakan marka RFLP dengan Kasalath sebagai tetua donor. Lokasi *Pup1* ini kemudian dipersempit jaraknya dengan pemetaan rapat (*fine mapping*) dan dibuat marka mikrosatelit untuk mendapatkan marka yang dekat dengan gen *Pup1* sekaligus untuk memudahkan proses seleksi (Wissuwa *et al.*, 2002). Posisi *Pup1* pada akhirnya dapat dipetakan dengan lebih dekat dengan gen target pada posisi 14,95–15,91 Mbp dan diperoleh marka-marka yang lebih spesifik untuk kegiatan *marker-assisted selection* (MAS) berupa marka *foreground* (Chin *et al.*, 2010, 2011).

Lokus *Pup1* diketahui berada pada posisi marka T5-4 dan 76H_7154 (kromosom 12) pada kegiatan *fine mapping*, dengan panjang fragmen diduga sebesar 145 kb, pada posisi 15.321.347 dan 15.466.417, yang telah didokumentasikan di bank gen dengan kode AB458444 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/-AB458444.1>). Analisis sekuen pada daerah lokus *Pup1* untuk membandingkan sekuen Kasalath dengan basis data Nipponbare telah dilakukan dan diketahui terdapat beberapa sekuen Kasalath yang unik yang tidak dimiliki oleh Nipponbare (Heuer *et al.*, 2009). Di dalam lokus tersebut, terdapat beberapa gen penting yang terlibat dalam penangkapan P. Salah satunya adalah gen *phosphorus-starvation tolerance* (*Pstol1*). Gen ini telah divalidasi dan terbukti menghasilkan protein kinase serin atau treonin yang berperan dalam proliferasi sel, diferensiasi sel, perkembangan embrio, dan kematian sel (Gamuyao *et al.*, 2012). Keberadaan gen *Pstol1* di dalam tanaman transgenik telah memicu pembentukan akar lebih cepat pada awal pertumbuhan sehingga tanaman

bisa mendapatkan P lebih cepat dan lebih banyak dibanding dengan tanaman lain yang tidak memiliki gen tersebut. Introgresi gen ini ke dalam tanaman padi diharapkan dapat meningkatkan produksi padi di daerah dengan ketersediaan P kurang. Eksplorasi gen-gen penting di dalam lokus *Pup1* juga telah dieksplorasi pada plasma nutfah yang lain untuk mencari donor *Pup1* selain Kasalath (Pariasca-Tanaka *et al.*, 2014).

Marka *single nucleotide polymorphism* (SNP), sebagai salah satu marka molekuler, sekarang telah menjadi salah satu pilihan dalam kegiatan pemuliaan padi karena jumlahnya yang sangat banyak dan proses pengerjaannya yang cepat (Prasetyono, 2011). Teknologi ini telah diaplikasikan pada tanaman padi hasil kultur anter (Jeong *et al.*, 2013) dan untuk membedakan keragaman di antara varietas/padi lokal di India (Choudhury *et al.*, 2014; Singh *et al.*, 2013). Di Indonesia, aplikasi marka SNP untuk analisis keragaman genetik telah dilakukan (Utami *et al.*, 2013, 2014). Teknologi ini berkembang cukup pesat, bahkan dapat diaplikasikan untuk analisis marka menggunakan teknik MAS.

Pada penelitian sebelumnya, telah dihasilkan galur-galur yang mengandung lokus *Pup1* dengan menggunakan metode *marker-assisted breeding* (MAB) pada enam persilangan, yakni Dodokan × Kasalath (DK), Dodokan × NIL-C443 (DN), Situ Bagendit × Kasalath (SK), Situ Bagendit × NIL-C443 (SN), Batur × Kasalath (BK), dan Batur × NIL-C443 (BN) (Prasetyono *et al.*, 2012). Galur-galur yang pada awal pembentukannya menggunakan marka molekuler sebagai alat seleksi pada persilangan konvensional telah sampai pada generasi BC₂F₈. Galur-galur tersebut perlu diuji lagi di lapang untuk mengetahui potensi hasilnya. Galur yang mengandung lokus *Pup1* diharapkan dapat memberikan hasil yang lebih tinggi dibanding dengan tetuanya pada kondisi P kurang tersedia. Tujuan penelitian ini adalah menganalisis galur-galur BC₂F₈ secara molekuler dan mengevaluasi potensi hasil galur-galur tersebut pada kondisi lapang yang berbeda.

BAHAN DAN METODE

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Biologi Molekuler, Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Bioteknologi dan Sumber Daya Genetik Pertanian, Bogor untuk analisis molekuler menggunakan marka spesifik *Pup1*, *International Rice Research Institute* (Filipina) untuk analisis marka SNP, dan Kebun Percobaan Taman Bogo (Provinsi Lampung) dan lahan petani di Desa Cikembar

(Kabupaten Sukabumi, Provinsi Jawa Barat) untuk uji lapang. Penelitian berlangsung mulai bulan November 2013 hingga Juni 2014.

Bahan tanaman yang digunakan adalah 32 galur BC₂F₈ dari enam persilangan, enam tetua persilangan (Dodokan, Situ Bagendit, Batur, Kasalath, NIL-C443, dan Nipponbare), dan dua varietas padi gogo sebagai cek (Inpago 7 dan Inpago 8) (Tabel 1). Untuk mendeteksi keberadaan lokus *Pup1*, dilakukan amplifikasi PCR lokus *Pup1* menggunakan primer spesifik, yakni marka K20-2 (Chin *et al.*, 2011) dengan sekuen F: TCAAAAATTTCTTCAGGTATGTACTCC dan R: TTGGGTGATCAGCTTTCAGA. Enzim restriksi yang digunakan untuk memotong hasil amplifikasi PCR adalah *Bsp12861*.

Analisis Molekuler

DNA diisolasi dari daun muda 32 galur BC₂F₈ padi *Pup1*, enam tetua, dan dua varietas cek yang ditumbuhkan terpisah dengan yang ada di lapang. Isolasi DNA dilakukan menggunakan metode Dellaporta *et al.* (1983) yang telah dimodifikasi. Daun segar dimasukkan ke dalam tabung mikro berukuran 2 ml lalu ditambahkan nitrogen cair. Campuran tersebut kemudian dihaluskan dengan menggunakan sumpit. Serbuk daun hasil gerusan ditambah larutan bufer ekstraksi, dimurnikan dengan kloroform-isoamil alkohol (Chisam), dan dipresipitasi menggunakan etanol absolut (96%). Kualitas DNA diukur dengan menggunakan metode elektroforesis gel agarosa, sedangkan kuantitas DNA diukur dengan menggunakan spektrofotometer NanoDrop™ 2000 (Thermo Scientific, USA).

Reaksi PCR dilakukan dalam volume 20 µl yang mengandung bufer PCR 1× (Tris-HCl 10 mM [pH 8,3], KCl 50 mM, MgCl₂ 1,5 mM, dan gelatin 0,01%), 100 µM dNTPs (dATP, dCTP, dGTP, dan dTTP), primer 0,5 µM (F dan R), 50 ng DNA, dan 1 unit Taq polimerase DNA. Program PCR yang digunakan dalam penelitian ini adalah 5 menit pada suhu 94°C untuk denaturasi permulaan, selanjutnya dilakukan 35 siklus yang terdiri atas 60 detik pada suhu 94°C untuk denaturasi, 60 detik pada suhu 55°C untuk penempelan primer, dan 120 detik pada suhu 72°C untuk perpanjangan primer. Perpanjangan primer terakhir dilakukan selama 7 menit pada suhu 72°C. Sebagian produk PCR kemudian dipisahkan menggunakan gel agarosa 1%. Pewarnaan DNA dilakukan dengan etidium bromida dan didokumentasi menggunakan ChemiDoc™ EQ System (Bio-Rad, USA).

Produk PCR yang menghasilkan pita DNA yang sesuai kemudian dipotong dengan enzim restriksi *Bsp12861*. Setiap sampel ditambah satu unit enzim dan diinkubasi selama 1 jam pada suhu 37°C. DNA hasil restriksi dipisahkan dengan gel agarosa 2%. Pada pita DNA hasil elektroforesis dilakukan pewarnaan dengan etidium bromida dan didokumentasi menggunakan ChemiDoc™ EQ System (Bio-Rad, USA). Pola pita yang dihasilkan pada setiap galur dibandingkan dengan pola pita tetua Kasalath atau NIL-C443. Galur yang memiliki pola pita seperti pola pita Kasalath atau NIL-C443 menunjukkan galur tersebut memiliki lokus *Pup1*. Pita yang dihasilkan dengan marka gen spesifik *Pup1* ini pada Kasalath dan Nipponbare masing-masing berukuran sekitar 982 bp dan 995 bp sebelum dipotong enzim

Tabel 1. Galur BC₂F₈, tetua, dan varietas cek yang digunakan pada uji daya hasil di lapang.

Kode lapang	Galur	Keterangan	Kode lapang	Galur	Keterangan
T1	-	Kasalath (tetua)	B10	SN3	BC ₂ F ₈ SB × NIL-C443#3
T2	-	NIL-C443 (tetua)	B11	SN4	BC ₂ F ₈ SB × NIL-C443#4
T3	-	Nipponbare (tetua)	B12	SN5	BC ₂ F ₈ SB × NIL-C443#5
T4	-	Inpago 7 (varietas cek)	B13	SN6	BC ₂ F ₈ SB × NIL-C443#6
T5	-	Inpago 8 (varietas cek)	B14	SN7	BC ₂ F ₈ SB × NIL-C443#7
A0	-	Dodokan (tetua)	C0	-	Batur (tetua)
A1	DK1	BC ₂ F ₈ Dodokan × Kasalath#1	C1	BK1	BC ₂ F ₈ Batur × Kasalath#1
A2	DK2	BC ₂ F ₈ Dodokan × Kasalath#2	C2	BK2	BC ₂ F ₈ Batur × Kasalath#2
A3	DN1	BC ₂ F ₈ Dodokan × NIL-C443#1	C3	BK3	BC ₂ F ₈ Batur × Kasalath#3
A4	DN2	BC ₂ F ₈ Dodokan × NIL-C443#2	C4	BK4	BC ₂ F ₈ Batur × Kasalath#4
B0	-	Situ Bagendit (tetua)	C5	BK5	BC ₂ F ₈ Batur × Kasalath#5
B1	SK1	BC ₂ F ₈ SB × Kasalath#1	C6	BK6	BC ₂ F ₈ Batur × Kasalath#6
B2	SK2	BC ₂ F ₈ SB × Kasalath #2	C7	BK7	BC ₂ F ₈ Batur × Kasalath#7
B3	SK3	BC ₂ F ₈ SB × Kasalath#3	C8	BN1	BC ₂ F ₈ Batur × NIL-C443#1
B4	SK4	BC ₂ F ₈ SB × Kasalath#4	C9	BN2	BC ₂ F ₈ Batur × NIL-C443#2
B5	SK5	BC ₂ F ₈ SB × Kasalath#5	C10	BN3	BC ₂ F ₈ Batur × NIL-C443#3
B6	SK6	BC ₂ F ₈ SB × Kasalath#6	C11	BN4	BC ₂ F ₈ Batur × NIL-C443#4
B7	SK7	BC ₂ F ₈ SB × Kasalath#7	C12	BN5	BC ₂ F ₈ Batur × NIL-C443#5
B8	SN1	BC ₂ F ₈ SB × NIL-C443#1	C13	BN6	BC ₂ F ₈ Batur × NIL-C443#6
B9	SN2	BC ₂ F ₈ SB × NIL-C443#2	C14	BN7	BC ₂ F ₈ Batur × NIL-C443#7

Bsp12861. Setelah dipotong enzim tersebut, dihasilkan beberapa pita, yakni tiga pita dengan ukuran sekitar 231, 349, atau 402 bp pada Kasalath, sedangkan pada Nipponbare dihasilkan dua pita berukuran sekitar 413 bp dan 582 bp (Chin *et al.*, 2011).

Sampel DNA seluruh tanaman dikirim ke IRRI untuk dilakukan analisis molekuler menggunakan marka SNP. Marka SNP yang digunakan sebanyak 4.606 marka. Analisis kekerabatan dilakukan dengan menggunakan program PowerMarker V 3.25. Perhitungan jarak genetik menggunakan rumus yang dideskripsikan oleh Nei *et al.* (1983). Hasil pengelompokan dalam program PowerMarker divisualisasikan menggunakan program TreeView (Win32).

Analisis *background* genetik setiap galur dilakukan dengan melihat pola alelnya. Dari sebanyak 4.606 marka, dipilih marka yang memiliki alel yang berbeda antara tetua pemulih (*recurrent parent*) dan tetua donor. Pola alel yang muncul pada setiap galur dibandingkan dengan pola alel tetuanya. Pola alel galur yang sama dengan tetua pemulih dihitung sebagai homozigot, sedangkan pola alel galur yang merupakan gabungan kedua tetua dihitung sebagai heterozigot. Jumlah alel homozigot inilah yang dijadikan dasar untuk melihat pola pengembalian genom ke tetua pemulih.

Uji Lapang

Penelitian lapang dilakukan di dua lokasi (Sukabumi dan Lampung) dengan karakteristik tanah tiap lokasi seperti terlihat pada Tabel 2. Lokasi Sukabumi menunjukkan memiliki P tersedia lebih banyak dibanding dengan lokasi Lampung. Percobaan dilakukan menggunakan Rancangan Acak Kelompok dengan empat ulangan. Tanaman yang diuji adalah 32 galur BC₂F₈ padi *Pup1*, enam tetua persilangan, dan dua varietas padi gogo sebagai cek (Tabel 1). Jarak tanam yang digunakan 25 cm × 25 cm, dengan ukuran petak 3 m × 4 m. Lubang tanam dibuat dengan penugalan yang ditanami 3–5 benih/lubang tanam. Pupuk yang digunakan adalah urea 250 kg/ha (tiga kali aplikasi: pada saat tanam, minggu keempat, dan minggu ketujuh setelah tanam), SP36 100 kg/ha (satu kali aplikasi: pada saat tanam), dan KCl 100 kg/ha (dua kali aplikasi: pada saat tanam dan minggu keempat setelah tanam). Pengamatan dilakukan terhadap peubah umur berbunga 50%, tinggi tanaman, jumlah anakan produktif, panjang malai, bobot gabah isi/rumpun, jumlah gabah isi dan hampa/malai, dan bobot gabah ubinan (1 m × 1 m). Data dianalisis menggunakan program SAS V.9 untuk analisis ragam (uji F) dengan taraf $\alpha = 5\%$. Uji lanjut-

Tabel 2. Karakteristik kimia dan fisik tanah pada lokasi percobaan di Sukabumi dan Lampung*.

Unsur	Satuan	Lokasi	
		Sukabumi	Lampung
C	%	0,87	1
N	%	0,08	0,11
C/N		11	9
P ₂ O ₅ (total)	mg/100 g	33	104
K ₂ O (total)	mg/100 g	3	13
P ₂ O ₅ (tersedia)	ppm	46,6	6,5
Ca ²⁺	cmolc/kg	2,65	12,74
Mg ²⁺	cmolc/kg	0,21	2,17
K ⁺	cmolc/kg	0,06	0,18
Na ⁺	cmolc/kg	0,32	0,49
KTK	cmolc/kg	4,06	18,32
Al ³⁺	cmolc/kg	0,31	0,2
H ⁺	cmolc/kg	0,26	0,15
Kejenuhan basa	%	80	85
Kejenuhan Al	%	8,14	1,26

*Berdasarkan uji tanah di Laboratorium Tanah, Balai Penelitian Tanah, BB Sumber Daya Lahan Pertanian, Kementerian Pertanian, bulan Januari 2014.

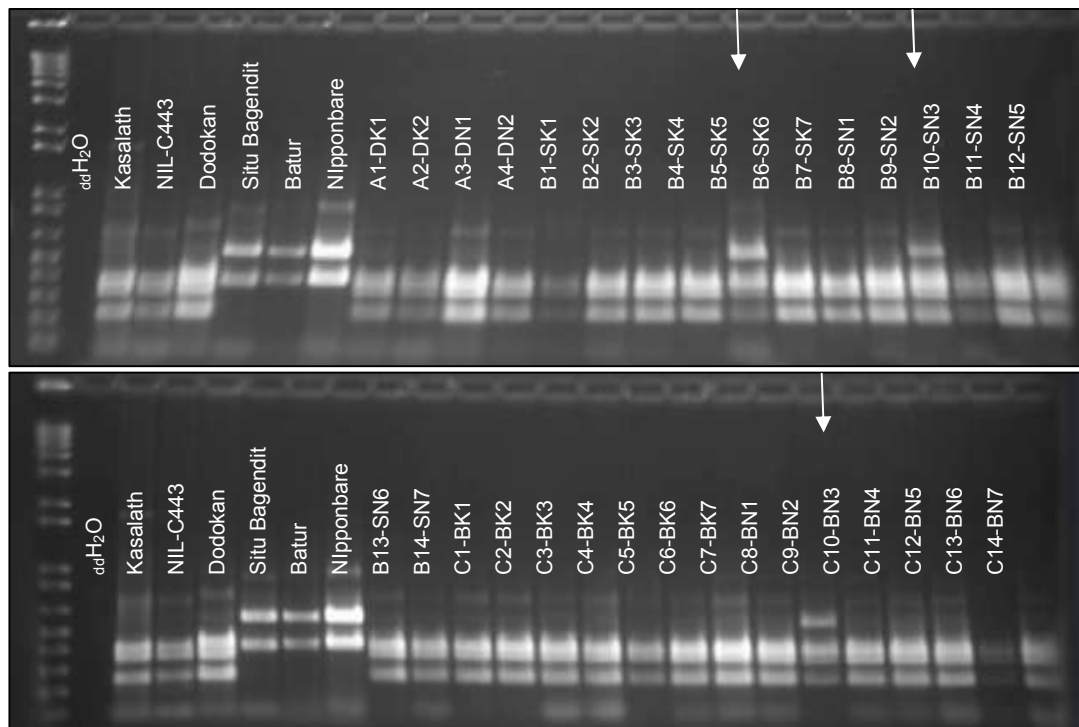
an menggunakan uji Dunnett pada taraf 5% dilakukan jika interaksi antar perlakuan berbeda nyata.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Analisis Molekuler

Hasil analisis molekuler pada lokus *Pup1* menunjukkan sebanyak 29 galur *Pup1* masih mengandung lokus *Pup1* dalam kondisi homozigot (Gambar 1). Tiga galur memiliki lokus tersebut dalam kondisi heterozigot, yakni B5-SK5, B9-SN2, dan C9-BN2, walaupun galur yang diuji sebelumnya pada tanaman BC₂F₂ telah dianalisis molekuler pada lokus *Pup1* dan berada dalam kondisi homozigot (Prasetyono *et al.*, 2012). Oleh karena kondisi homozigot tersebut, pada tanaman BC₂F₃ dan BC₂F₄ tidak dilakukan analisis molekuler, dengan asumsi tidak terjadi pindah silang pada generasi tersebut.

Kondisi penyimpangan tersebut juga terjadi pada tanaman BC₂F₅ dan BC₂F₆ galur-galur *Pup1* (Tasliyah *et al.*, 2015; Wardoyo *et al.*, 2014). Wardoyo *et al.* (2014) juga membuktikan bahwa pada beberapa galur *Pup1* turunan Situ Bagendit (BC₂F₆), sebagian alel di dalam lokus *Pup1* mengandung alel Situ Bagendit dalam kondisi homozigot, tapi sebagian homozigot untuk *Pup1*. Namun, sebagian besar genom di luar lokus *Pup1* tersebut telah kembali ke tetua pemulih. Hal ini mustahil terjadi apabila terjadi penyerbukan silang dengan tetua Situ Bagendit pada tanaman BC₂F₃ s.d. BC₂F₄. Apabila terjadi penyerbukan silang, genom di luar lokus *Pup1* sebagian besar pasti berada dalam kondisi heterozigot. Fenomena ini memang jarang terjadi dan masih sulit dijelaskan.

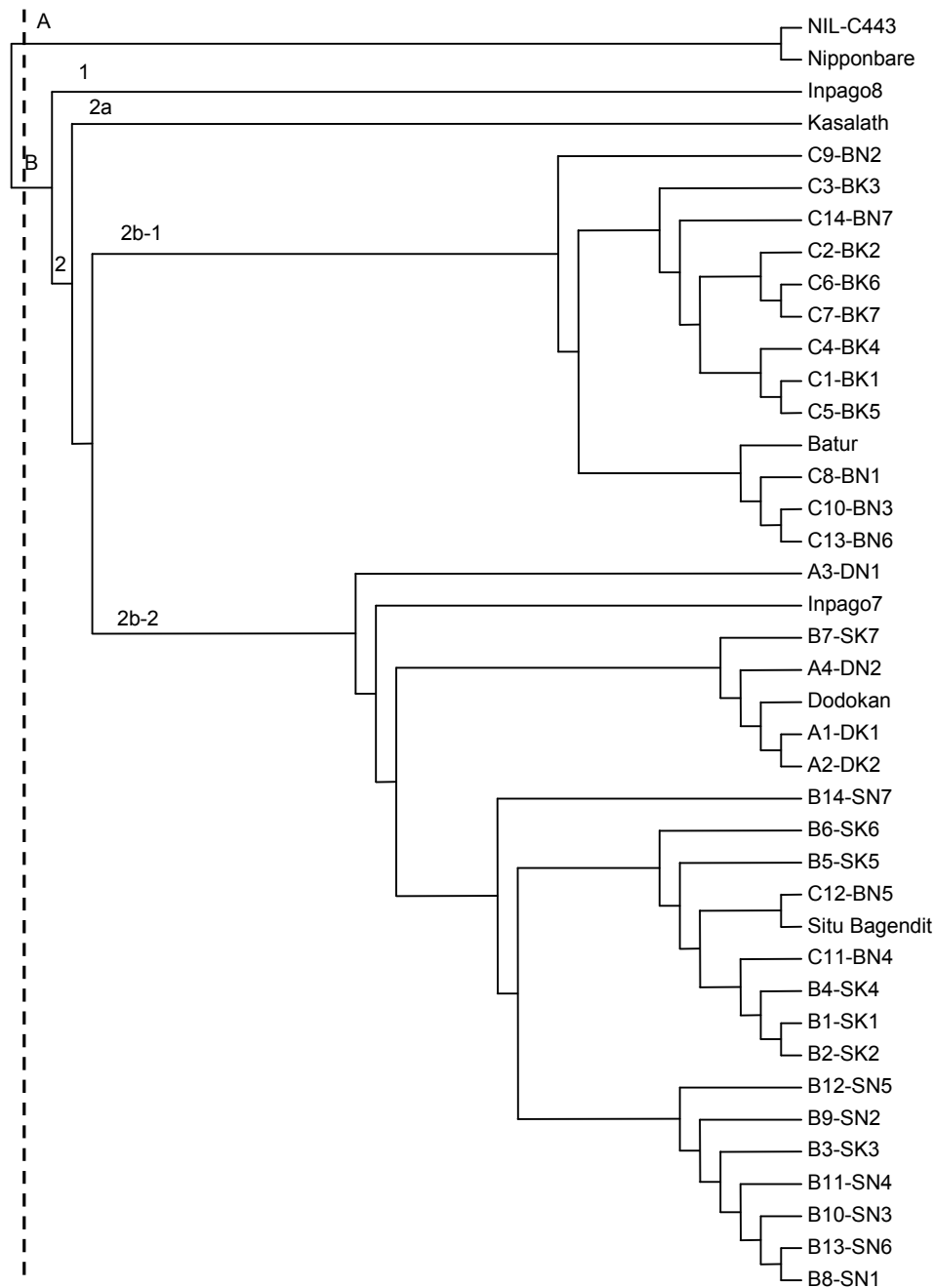


Gambar 1. Hasil amplifikasi galur-galur *Pupa1* menggunakan marka spesifik Kas20-2 yang telah dipotong dengan enzim restriksi *Bsp12861*. Tanda panah menunjukkan galur yang memiliki pita heterozigot. ddH_2O digunakan sebagai kontrol negatif.

Pada analisis pengelompokan menggunakan 4.606 marka SNP (Gambar 2), terlihat galur *Pupa1* terbagi menjadi dua kelompok A dan B, dengan kelompok B terbagi menjadi dua (1 dan 2). Kelompok 2b-1 didominasi oleh turunan Batur, sedangkan kelompok 2b-2 didominasi oleh turunan Dodokan dan Situ Bagendit. Hal ini menunjukkan turunan Dodokan, Situ Bagendit, ataupun Batur masing-masing masih memiliki hubungan kekerabatan yang dekat dengan tetuanya, walaupun ada beberapa yang mengalami perbedaan yang cukup jauh. Sebagai contoh, C11-BN4 dan C12-BN5 yang mengelompok menjadi satu dengan kelompok 2b-2 bagian Situ Bagendit. Galur B7-SK7 yang mengelompok di kelompok 2b-2 bagian Dodokan mestinya masuk ke dalam kelompok 2b-2 bagian Situ Bagendit. Namun, secara umum pengelompokan ini menunjukkan pengembalian ke tetua pemulih telah berlangsung dengan baik. Terbukti, tidak ada galur yang mengelompok dengan Kasalath ataupun NIL sebagai tetua donor. Galur B5-SK5, B9-SN2, dan C9-BN2 yang lokus *Pupa1*-nya sebagian dalam kondisi heterozigot juga mengelompok sesuai dengan tetua pemulih masing-masing. NIL-C443 dan Nipponbare sebagai padi tipe *japonica* mengelompok tersendiri (kelompok A), sedangkan Kasalath sebagai padi tipe *aus* mengelompok tersendiri juga (kelompok 2a).

Berdasarkan perhitungan statistik pada marka SNP masing-masing, tercatat SNP yang dipakai untuk analisis PowerMarker sebanyak 184.240, dengan perincian $-/-$ (kosong) sebanyak 8.405, A/A: 38.069, A/G: 2.342, A/T: 0, A/C: 0, G/A: 0, G/G: 49.627, G/T: 0, G/C: 0, T/A: 0, T/G: 677, T/T: 36.060, T/C: 2.104, C/A: 0, C/G: 0, C/T: 0, dan C/C: 46.160. Berdasarkan data tersebut, SNP yang terkandung di dalam genom seluruh sampel masih didominasi oleh pola yang homozigot, yakni A/A, G/G, T/T, dan C/C. Hanya sebagian kecil tanaman yang menunjukkan pola heterozigot. Hal ini disebabkan tanaman yang digunakan merupakan generasi lanjut.

Berdasarkan perhitungan jumlah lokus yang homozigot untuk tetua pemulih (Dodokan, Situ Bagendit, dan Batur), terlihat terdapat beberapa galur yang memiliki jumlah lokus homozigot terbanyak, yaitu A1-DK1, A4-DN2, B1-SK1, B11-SN4, C3-BK3, dan C13-BN6 (Gambar 3). Hal ini menunjukkan bahwa pada galur-galur tersebut telah terjadi pengembalian genom tetua pemulih dengan jumlah yang paling besar. Galur-galur tersebut mestinya akan memiliki sifat mendekati tetua pemulihnya lebih baik dibanding dengan galur-galur yang tingkat homozigotnya lebih sedikit. Walaupun galur-galur ini termasuk galur yang superior, hubungan kekerabatan dengan tetua pemulih tidak selalu lebih dekat (Gambar 2).



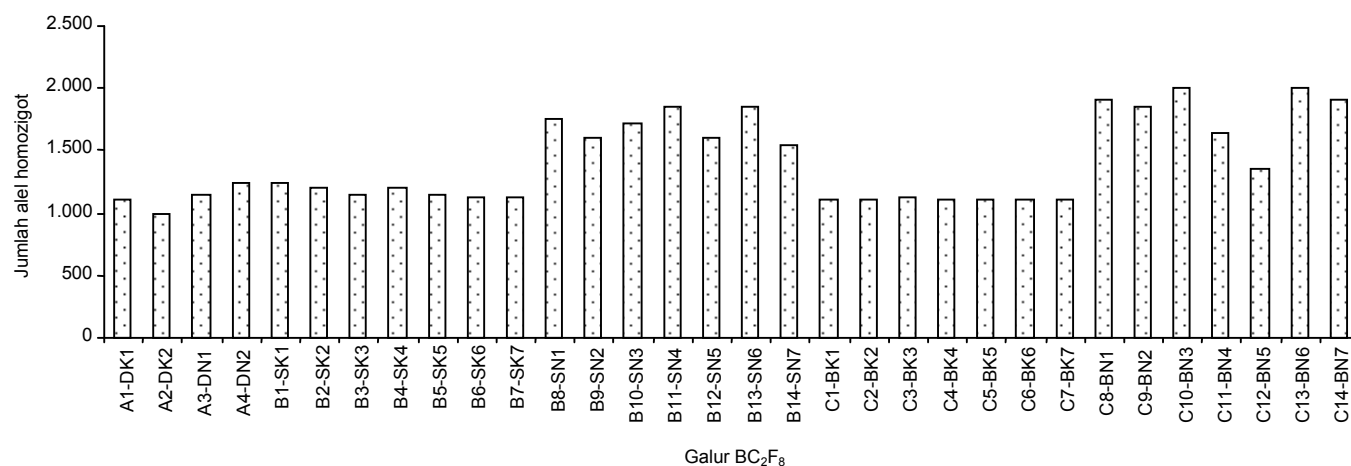
Gambar 2. Hasil pengelompokan galur-galur BC₂F₈ dan tetuanya menggunakan 4.606 marka SNP, dengan menggunakan koefisien kesamaan Nei *et al.* (1983) pada metode pengelompokan UPGMA.

Uji Lapang

Analisis sidik ragam peubah-peubah yang diamati dapat dilihat pada Tabel 3. Beberapa peubah, seperti bobot gabah isi/rumpun dan jumlah gabah isi/malai, tidak berbeda nyata, walaupun berada pada dua lingkungan yang berbeda. Analisis lanjutan dari peubah-peubah yang berbeda nyata dapat dilihat pada Tabel 4. Peubah yang berbeda nyata pada dua lingkungan yang berbeda menunjukkan perbedaan

kandungan P tersedia memengaruhi penampilan, seperti umur berbunga, tinggi tanaman, jumlah anakan produktif, panjang malai, bobot gabah isi/malai, bobot 100 butir isi, jumlah gabah hampa/malai, persentase gabah isi, dan bobot ubinan. Hal ini menunjukkan kadar P tersedia memengaruhi pertumbuhan galur-galur *Pup1*.

Berdasarkan Tabel 4, galur-galur Dodokan-*Pup1* tidak menunjukkan perbedaan dengan tetuanya pada



Gambar 3. Jumlah alel homozigot marka SNP untuk tetua pemulih (Dodokan, Situ Bagendit, atau Batur) untuk setiap persilangan. Tanda panah menunjukkan galur BC₂F₈ yang mempunyai lokus homozigot terbanyak untuk tetua pemulih.

Tabel 3. Analisis ragam beberapa peubah uji daya hasil galur-galur *Pup1* di dua lokasi (Lampung dan Sukabumi) tahun 2013–2014.

Peubah	Sumber keragaman			Koefisien keragaman (%)
	Lokasi	Genotipe	Lokasi × Genotipe	
Umur berbunga (hari)	**	**	**	5,18
Tinggi tanaman (cm)	tn	**	**	7,72
Jumlah anakan produktif	**	**	**	14,41
Panjang malai (cm)	**	**	*	5,46
Bobot gabah isi/rumpun (g)	**	**	tn	21,12
Bobot gabah isi/malai (g)	**	**	**	13,83
Bobot 100 bulir isi (g)	**	**	**	12,98
Jumlah gabah isi/malai	**	**	tn	17,47
Jumlah gabah hampa/malai	**	**	**	47,04
Persentase gabah isi	**	**	*	10,64
Bobot ubinan (kg)	**	**	**	21,26

* = berbeda nyata pada taraf 5%, ** = berbeda nyata pada taraf 1%, tn = tidak berbeda nyata.

semua peubah. Ini menunjukkan *Pup1* tidak memberikan efek yang besar pada turunan Dodokan. Pada Situ Bagendit-*Pup1*, galur B5-SK5 (Sukabumi) menunjukkan umur berbunga lebih genjah dibanding dengan tetuanya, demikian juga galur B7-SK7 (Sukabumi) yang memiliki jumlah anakan produktif lebih banyak dibanding dengan tetuanya. Pada Batur-*Pup1*, galur yang berbeda nyata dengan tetuanya adalah C10-BN3 yang di Sukabumi mempunyai umur berbunga lebih lama, C5-BK5 di Sukabumi dan C11-BN4 di Lampung dan Sukabumi dengan jumlah anakan produktif lebih banyak. Galur B5-SK5 memiliki lokus *Pup1* dalam kondisi heterozigot, sedangkan galur B7-SK7, C5-BK5, C10-BN3, dan C11-BN4 memiliki lokus *Pup1* dalam kondisi homozigot.

Pada peubah jumlah anakan produktif, bobot gabah isi/malai, dan bobot ubinan, untuk rerata galur-galur *Pup1* turunan Situ Bagendit dan Batur terjadi peningkatan di dua lokasi dibanding dengan tetua masing-masing. Beberapa galur juga menunjukkan peningkatan untuk peubah tersebut, walaupun secara

statistik tidak berbeda nyata. Hal ini menunjukkan lokus *Pup1* memberikan efek positif terhadap peningkatan ketiga peubah tersebut pada galur-galur yang diuji. Khusus untuk peubah jumlah anakan produktif, rerata galur-galur *Pup1* lebih banyak pada kondisi kurang P di Lampung dibanding dengan kondisi cukup P di Sukabumi, namun pada penghitungan bobot gabah ubinan kondisi cukup P di Sukabumi, hasilnya lebih banyak dibanding dengan kondisi kurang P (Lampung). Hal ini menunjukkan peningkatan komponen pertumbuhan lebih jelas terlihat pada kondisi kurang P, namun pada pengisian biji tetap memerlukan kondisi cukup P. Pada penelitian sebelumnya, Prasetyono *et al.* (2012) melaporkan galur-galur *Pup1* memiliki bobot kering tajuk lebih baik dibanding dengan tetuanya, namun pada saat pembentukan biji hasil yang diperoleh bervariasi. Gamuyao *et al.* (2012) melaporkan pembentukan akar yang lebih banyak terjadi pada tanaman padi-*Pup1* dibanding dengan tetuanya sehingga memberikan peluang tanaman akan tumbuh lebih baik pada kondisi kurang P.

Tabel 4. Keragaman beberapa peubah galur-galur *Pup1* hasil uji lapangan di dua lokasi (Sukabumi dan Lampung).

Varietas/galur	Umur berbunga (hari)		Tinggi tanaman (cm)		Jumlah anakan produktif		Panjang malai (cm)		Bobot gabah isi/malai (g)		Bobot 100 butir (g)		Jumlah gabah hampa/malai		Persentase gabah isi		Bobot ubinan (1 m × 1 m) (kg)	
	Skb	Lp	Skb	Lp	Skb	Lp	Skb	Lp	Skb	Lp	Skb	Lp	Skb	Lp	Skb	Lp	Skb	Lp
Kasalath NIL-C443	95,0	82,0	126,4	116,1	20,9	22,6	21,0	22,8	1,9	4,5	1,0	1,7	47,5	14,63	81,0	89,5	0,62	0,36
Nipponbare	88,0	-	70,0	-	23,0	-	16,0	-	2,0	-	3,3	-	26,2	-	70,0	-	0,65	-
Inpago 7	107,0	97,3	138,3	120,0	17,6	9,05	25,6	28,2	2,95	6,4	1,4	2,4	168,1	35,45	57,0	77,4	0,81	0,44
Inpago 8	101,5	91,5	123,1	114,3	15	12,2	25,9	27,9	2,9	8,9	1,1	2,6	145,0	22,90	65,1	88,5	0,56	0,48
Dodokan	85,0	86,3	87,6	84,1	24,4	27,0	22,0	22,9	2,5	3,2	1,5	2,0	34,7	16,73	83,1	81,4	0,50	0,27
A1-DK1	87,3	86,3	89,7	85,1	22,2	20,4	21,6	22,5	2,5	2,9	2,1	2,2	36,9	18,10	77,8	79,1	0,44	0,20
A2-DK2	86,7	88,8	89,8	87,1	25,7	19,6	22,0	21,9	2,3	3,5	1,5	2,1	28,9	17,40	85,7	83,1	0,43	0,22
A3-DN1	84,7	88,8	85,3	76,2	22,5	21,0	21,7	21,0	2,5	3,3	1,6	2,2	29,9	15,53	85,0	83,2	0,46	0,24
A4-DN2	84,5	84,3	82,4	77,3	21,7	20,6	21,4	20,8	2,6	3,4	1,9	2,5	33,9	15,45	81,0	82,2	0,42	0,34
Rerata galur	85,8	87,1	86,8	81,4	23,0	20,4	21,7	21,6	2,5	3,3	1,8	2,3	32,4	16,62	82,4	81,9	0,44	0,25
Situ Bagendit	100,3	91,8	86,6	76,0	19,4	22,9	22,9	22,6	2,7	4,3	1,9	2,6	88,8	17,53	63,5	83,3	0,41	0,37
B1-SK1	98,3	90,0	88,7	87,9	20,8	26,1	23,9	22,2	2,7	4,1	1,9	2,5	60,3	8,80	72,9	90,4	0,41	0,38
B2-SK2	97,5	91,0	87,8	80,4	20,2	26,5	22,7	21,9	2,6	4,0	1,5	2,4	74,7	11,57	73,0	86,3	0,51	0,40
B3-SK3	98,0	91,0	92,5	93,3*	21,0	22,7	23,0	23,2	2,6	5,0	1,5	2,7	89,5	13,43	67,5	85,7	0,53	0,47
B4-SK4	101,0	89,5	85,5	84,6	21,9	26,7	23,9	22,3	2,4	3,9	1,3	2,3	97,6	15,08	68,7	85,1	0,46	0,37
B5-SK5	94,8*	86,5	132,0*	125,4*	16,9	19,5	26,1	27,3	2,6	4,0	1,5	2,6	29,9	22,85	85,2	80,4	0,43	0,27
B6-SK6	102,5	88,1	90,7	88,6*	25,4	28,0	22,5	22,3	2,4	4,3	1,3	2,4	60,8	11,95	75,7	88,1	0,43	0,49
B7-SK7	100,5	88,7	92,7	88,4*	27,2*	26,6	22,5	22,0	2,5	4,2	1,6	2,3	57,3	16,47	74,3	85,1	0,46	0,30
B8-SN1	102,0	90,3	91,3	76,6	18,9	22,2	23,3	22,3	2,8	4,6	1,7	2,5	120,1	21,73	59,7	78,2	0,47	0,34
B9-SN2	101,3	90,3	96,7	76,7	21,4	23,7	22,2	23,2	2,9	5,1	1,8	2,7	97,7	13,75	63,3	87,6	0,53	0,41
B10-SN3	102,5	92,0	87,0	79,1	22,6	23,7	21,8	21,6	3,0	5,2	1,7	2,7	77,0	13,00	72,1	86,8	0,45	0,31
B11-SN4	104,0	89,8	82,8	78,9	21,2	25,2	24,3	23,5	2,7	4,8	1,4	2,5	121,6	12,98	64,8	87,9	0,36	0,41
B12-SN5	100,0	96,0	85,5	79,9	22,8	23,1	23,4	23,5	2,8	4,6	1,7	2,5	86,3	9,30	67,2	90,0	0,47	0,33
B13-SN6	101,8	90,7	87,2	83,3	18,8	21,3	22,0	23,0	2,8	5,1	1,8	2,5	108,1	18,50	61,9	83,4	0,50	0,35
B14-SN7	104,3	90,0	88,5	84,2	17,6	19,3	22,7	23,7	2,6	4,9	1,5	3,0	80,4	16,55	69,8	86,5	0,34	0,46
Rerata galur	100,6	90,3	92,0	86,2	21,2	23,9	23,2	23,1	2,7	4,6	1,6	2,5	82,9	15,2	69,7	85,8	0,45	0,38
Batur	101,0	90,3	111,4	121,1	13,5	15,3	24,8	27,6	2,4	6,2	0,9	2,3	180,2	43,7	59,6	78,8	0,46	0,34
C1-BK1	101,0	90,7	108,4	117,6	14,6	19,7	23,3	24,8*	2,5	5,0	1,1	2,2	81,7	39,6	74,4	73,5	0,40	0,41
C2-BK2	101,3	100,8	102,8	117,3	13,8	18,0	24,6	25,5	2,5	5,8	1,3	2,3	131,3	38,9	59,6	76,7	0,40	0,40
C3-BK3	99,7	98,0	116,3	105,5*	18,1	17,8	24,2	24,8*	2,4	6,6	0,9	2,1	79,9	33,5	77,8	80,6	0,53	0,28
C4-BK4	99,7	95,3	120,9	127,7	12,9	16,8	26,8	26,6	2,5	7,1	0,9	2,3	132,1	43,9	69,2	77,4	0,53	0,39
C5-BK5	99,0	93,5	121,1	111,7	19,0*	16,2	23,9	24,6*	2,3	5,1	1,0	2,1	125,9	33,3	66,3	76,1	0,50	0,28
C6-BK6	101,0	96,0	109,9	115,0	15,1	17,9	24,7	25,8	2,4	5,8	1,1	2,1	126,5	48,6	63,4	74,3	0,48	0,31
C7-BK7	100,3	86,7	111,6	115,7	16,2	15,3	24,3	25,1	2,6	5,6	1,3	2,0	111,6	45,1	64,6	72,9	0,53	0,46
C8-BN1	101,5	94,0	113,7	119,1	10,7	11,9	25,2	26,4	2,6	6,7	1,0	2,4	137,9	43,4	66,7	76,6	0,45	0,28
C9-BN2	101,5	103,0	106,9	123,1	11,2	12,9	23,7	28,2	2,4	7,0	1,0	2,3	130,6	39,5	65,1	76,2	0,33	0,30
C10-BN3	106,5*	88,3	117,1	126,8	12,7	16,0	25,5	26,6	2,6	6,4	1,1	2,4	161,6	44,2	60,7	78,4	0,40	0,38
C11-BN4	97,5	82,0	82,5*	80,7*	22,0*	28,4*	23,1	22,0*	2,6	4,2	1,7*	2,5	108,7	18,7	60,8	83,6	0,42	0,34
C12-BN5	100,5	86,0	118,6	127,4	11,8	15,9	25,4	26,8	2,5	7,7	0,9	2,3	156,7	49,0	64,1	77,8	0,46	0,51
C13-BN6	100,3	76,0	114,4	124,0	11,7	13,7	26,2	28,2	2,5	7,8	0,8	2,3	140,6	45,7	68,7	78,6	0,49	0,31
C14-BN7	101,0	90,0	115,0	120,2	14,1	15,7	25,3	27,1	2,5	6,2	1,0	2,4	130,7	50,3	65,8	74,2	0,47	0,33
Rerata galur	100,8	91,5	111,4	116,6	14,6	16,9	24,7	25,9	2,5	6,2	1,1	2,3	125,3	41,0	66,2	76,9	0,46	0,36

Skb = Sukabumi, Lp = Lampung.

*Berbeda nyata dengan tetua Dodokan, Situ Bagendit, atau Batur pada uji Dunnet dengan taraf 5%.

Berdasarkan peubah bobot ubinan, galur-galur *Pup1* yang memiliki potensi diuji lebih lanjut untuk daerah P tersedia atau cukup adalah galur B1-SK1, B2-SK2, B3-SK3, B4-SK4, B6-SK6, B9-SN2, C4-BK4, C7-BK7, dan C12-BN5. Galur-galur tersebut memiliki bobot ubinan lebih banyak dibanding dengan tetua Situ Bagendit ataupun Batur. Pada kondisi P cukup tersedia, tetua Kasalath dan varietas cek Inpago 7 dan Inpago 8 memiliki potensi hasil yang tinggi. Namun, pada kondisi P tersedia kurang dengan kadar Al yang tinggi, ketiga genotipe tersebut mengalami penurunan hasil yang cukup signifikan. Penurunan hasil galur-galur *Pup1* pada daerah P cukup dan kurang tersedia tidak sebanyak ketiga genotipe tersebut. Galur *Pup1* yang memiliki bobot ubinan tinggi pada daerah P kurang tersedia yang melebihi Inpago 7 dan Inpago 8

adalah B6-SK6 dan C12-BN5. Dua galur ini berpotensi memberikan hasil tinggi apabila ditanam di daerah miskin hara. Locus *Pup1* diharapkan dapat membantu tanaman memperoleh P pada kondisi tersebut.

KESIMPULAN

Dua puluh sembilan galur BC₂F₈ mengandung locus *Pup1* dalam kondisi homozigot, sedangkan tiga galur (B5-SK5, B9-SN2, dan C9-BN2) dalam kondisi heterozigot.

Seluruh galur *Pup1* memiliki susunan genom seperti genom tetua Dodokan, Situ Bagendit, atau Batur, kecuali B7-SK7, C10-BN3, dan C11-BN4.

Galur B1-SK1, B2-SK2, B3-SK3, B4-SK4, B6-SK6, B9-SN2, C4-BK4, C7-BK7, dan C12-BN5 memiliki bobot ubinan lebih tinggi dibanding dengan tetua pemulihnya (Situ Bagendit atau Batur) pada daerah dengan P kurang ataupun cukup tersedia.

Galur B6-SK6 dan C12-BN5 memiliki bobot ubinan lebih tinggi dibanding dengan tetua pemulih dan varietas cek Inpago 7 dan Inpago 8 pada kondisi P kurang tersedia.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penelitian ini dibiayai oleh Proyek Generation Challenge Programme dengan judul *Drought from a different perspective: Improved tolerance through phosphorus acquisition* TA 2013/2014. Ucapan terima kasih juga disampaikan kepada Sdr. Fajar Suryawan, Yana Suryana, dan Mahrup yang telah membantu penelitian lapang.

DAFTAR PUSTAKA

- Chen, L., L. Lin, G. Cai, Y. Sun, T. Huang, K. Wang, and J. Deng. 2014. Identification of nitrogen, phosphorus, and potassium deficiencies in rice based on static scanning technology and hierarchical identification method. *PLoS One* 9(11):e113200. doi:10.1371/journal.pone.0113200.
- Chin, J.H., R. Gamuyao, C. Dalid, M. Bustamam, J. Prasetyono, S. Moeljopawiro, M. Wissuwa, and S. Heuer. 2011. Developing rice with high yield under phosphorus deficiency: *Pup1* sequence to application. *Plant Physiol.* 156:1202–1216.
- Chin, J.H., X. Lu, S.M. Haefele, R. Gamuyao, A.M. Ismail, M. Wissuwa, and S. Heuer. 2010. Development and application of gene-based markers for the major rice QTL *phosphorus uptake 1*. *Theor. Appl. Genet.* 120:1073–1086.
- Choudhury, D.R., N. Singh, A.K. Singh, S. Kumar, K. Srinivasan, R.K. Tyagi, A. Ahmad, N.K. Singh, and R. Singh. 2014. Analysis of genetic diversity and population structure of rice germplasm from North-Eastern region of India and development of a core germplasm set. *PLoS One* 9(11):e113094. doi:10.1371/journal.pone.0113094.
- Dellaporta, S.L., J. Wood, and J.B. Hicks. 1983. A plant DNA miniprep: Version II. *Plant. Mol. Biol. Rep.* 1(4):19–21.
- Gamuyao, R., J.H. Chin, J.P. Tanaka, P. Pesaresi, S. Catausan, C. Dalid, I.S. Loedin, E.M.T. Mendoza, M. Wissuwa, and S. Heuer. 2012. The protein kinase *Pstol1* from traditional rice confers tolerance of phosphorus deficiency. *Nature* 488. doi:10.1038/nature11346.
- Heuer, S., X. Lu, J.H. Chin, J.P. Tanaka, H. Kanamon, T. Matsumoto, T.D. Leon, V.J. Ulat, A.M. Ismail, M. Yano, and M. Wissuwa. 2009. Comparative sequence analyses of the major quantitative trait locus *phosphorus uptake 1 (Pup1)* reveal a complex genetic structure. *Plant Biotech. J.* 7:456–471.
- Jeong, I.S., U.H. Yoom, G.S. Lee, H.S. Ji, H.J. Lee, C.D. Han, J.H. Hahn, G. An, and T.H. Kim. 2013. SNP-based analysis of genetic diversity in anther-derived rice by whole genome sequencing. *Rice* 6(6):1–12.
- Nei, M., F. Tajima, and Y. Tatenno. 1983. Accuracy of estimated phylogenetic trees from molecular data. II. Gene frequency data. *J. Mol. Evol.* 19(2):53–70.
- Pariasca-Tanaka, J., J.H. Chin, K.N. Dramé, C. Dalid, S. Heuer, and M. Wissuwa. 2014. A novel allele of the P-starvation tolerance gene *OsPSTOL1* from African rice (*Oryza glaberrima* Steud) and its distribution in the genus *Oryza*. *Theor. Appl. Genet.* 127:1387–1398. doi:10.1007/s00122-014-2306-y.
- Prasetyono, J. 2011. Marka SNP: Marka molekuler masa depan. *Warta Biogen* 7(2):9–12.
- Prasetyono, J., T. Suhartini, I.H. Soemantri, Tasliah, S. Moeljopawiro, H. Aswidinnoor, D. Sopandie, dan M. Bustamam. 2012. Evaluasi beberapa galur *Pup1* tanaman padi (*Oryza sativa* L.) pada larutan hara dan lapangan. *J. Agron. Indonesia* 40(2):83–90.
- Singh, N., D.R. Choudhury, A.K. Singh, S. Kumar, K. Srinivasan, R.K. Tyagi, N.K. Singh, and R. Singh. 2013. Comparison of SSR and SNP markers in estimation of genetic diversity and population structure of Indian rice varieties. *PLoS One* 8(12):e84136. doi:10.1371/journal.pone.0084136.
- Tasliah, J. Prasetyono, T. Suhartini, dan I.H. Soemantri. 2015. Ketahanan galur-galur *Pup1* terhadap penyakit blas. *J. Pen. Pert. Tan. Pangan* 34(1):29–36.
- Utami, D.W. dan I. Hanarida. 2014. Evaluasi lapang dan identifikasi molekuler plasma nutfah padi terhadap keracunan Fe. *J. AgroBiogen* 10(1):9–17.
- Utami, D.W., I. Rosdianti, P. Lestari, D. Satyawan, H. Rijzaani, and I.M. Tasma. 2013. Development and application of 1536-plex single nucleotide polymorphism marker chip for genome wide scanning of Indonesian rice germplasm. *Indones. J. Agric. Sci.* 14(2):71–78.
- Wardoyo, S.H., Miftahudin, S. Moeljopawiro, dan J. Prasetyono. 2014. Konstitusi genetik dan karakter fenotipik galur-galur padi *Pup1* turunan varietas Situ Bagendit. *J. AgroBiogen* 10(2):61–68.
- Wissuwa, M., J.N. Wegner, N. Ae, and M. Yano. 2002. Substitution mapping of *Pup1*: A major QTL increasing phosphorus uptake of rice from a phosphorus-deficient soil. *Theor. Appl. Genet.* 105:890–897.

Wissuwa, M., M. Yano, and N. Ae. 1998. Mapping of QTLs for phosphorus-deficiency tolerance in rice (*Oryza sativa* L.). *Theor. Appl. Genet.* 97:777–783.

Yuwono, N.W. 2009. Membangun kesuburan tanah di lahan marginal. *J. Ilmu Tanah dan Lingkungan* 9(2):137–141.
